



TITLE:

Study on screening of novel pathogenic factors of *Candida albicans* by proteome analysis and its putative virulent mechanism(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Kitahara, Nao

CITATION:

Kitahara, Nao. Study on screening of novel pathogenic factors of *Candida albicans* by proteome analysis and its putative virulent mechanism. 京都大学, 2016, 博士(農学)

ISSUE DATE:

2016-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k19774>

RIGHT:

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	北原奈緒
論文題目	Study on screening of novel pathogenic factors of <i>Candida albicans</i> by proteome analysis and its putative virulent mechanism (プロテオーム解析による <i>Candida albicans</i> の新規病原因子の探索とその作用機序の推定)		
(論文内容の要旨)			
<p>カンジダ症とは、常在性真菌<i>Candida albicans</i>によって引き起こされる日和見感染症である。健常者においては、免疫細胞のマクロファージが<i>C. albicans</i>の病原性を抑制する。しかし、高齢やAIDSなどによる免疫力低下を契機として、<i>C. albicans</i>は病原性を発揮する。<i>C. albicans</i>は病原性タンパク質を生産することで、マクロファージから脱出し血流を通して全身の臓器に感染を広げていくことが推定されている。</p> <p>本研究は、新規薬剤開発の一助として、<i>C. albicans</i>の病原性候補タンパク質の生化学的性質の解明、およびプロテオーム解析による新規病原因子の探索と同定を通して、その病原性を理解することを試みた。</p> <p>1. <i>C. albicans</i> の病原性候補タンパク質 Als (Agglutinin-like sequence) の性質解明</p> <p><i>C. albicans</i>の主要な病原性タンパク質の候補として、接着因子Alsが挙げられる。<i>C. albicans</i>にとって接着因子は、様々な細胞へ侵入するための第一段階において、また互いに接着して強固なバイオフィルムを形成する上で重要であると推定されている。Alsに関しては、免疫細胞との相互作用、血管への侵入、医療機器への付着などに重要であるとの報告がなされている。しかし、その詳細な生化学的性質には不明な部分が多い。本研究では、<i>C. albicans</i>の接着性へのAlsタンパク質の関与を調べた。</p> <p><i>C. albicans</i>の9種のAlsをそれぞれ酵母<i>Saccharomyces cerevisiae</i>に生産させ、蛍光抗体染色によって細胞壁表層への輸送と局在を確認した。各Alsの接着能を調べたところ、9種類のAlsは、医療器具に使用されているポリプロピレンやホウケイ酸ガラスに強く結合した。その結合には、Alsタンパク質の疎水的物性ではなく、タンパク質の構造が重要であることが推測された。</p> <p>2. <i>C. albicans</i> の血液適応に関与する新規病原性候補タンパク質の探索</p> <p>ヒト常在性の <i>C. albicans</i>が全身に感染するためには、まず血管へと侵入する必要がある。この血管内で<i>C. albicans</i>は、栄養欠乏や免疫細胞の存在などによるストレスにさらされると考えられる。これまでに、<i>C. albicans</i>の血液適応過程に関して、トランスクリプトーム解析や各種耐性タンパク質の研究などが行われてきた。しかし、既知の病原因子だけでは<i>C. albicans</i>の血液適応過程を説明できておらず、未知の病原因子の存在が推定されている。</p> <p>血液適応過程に関与する新規病原性タンパク質検索と同定のため、<i>C. albicans</i>に関して時系列定量プロテオーム解析を行った。本プロテオーム解析では、高分離能モノリスカラムを装着したナノLC-MS/MSシステムを用いた。このカラムにより、ペプチドの分離能を向上させることで、変化量の大きい代謝系酵素のために検出しにくいこ</p>			

とが推定される微量病原性タンパク質の変動を検出することも可能になると考えた。血液モデルとしてFBS (fetal bovine serum) を採用した。FBSとコントロールのYPD培地中で*C. albicans*を培養し、0, 30, 60, 120, 180分の各時間において菌体を回収し、それぞれの菌体の定量プロテオーム解析を行った。FBS存在下では、酸化ストレス耐性や、グルコース取り込み、クエン酸回路、酸化的リン酸化、イオン獲得関連のタンパク質が多く生産されていることが分かった。これらを利用して、*C. albicans*はストレスに耐え、栄養を取り込んでエネルギーを生産し、血液環境で生存していることが推定された。さらに、FBS存在下で顕著に生産されていた機能未知タンパク質Orf19.4914.1を同定し、Blp1 (Blood-induced peptide 1) と命名した。Blp1の機能探索のため、*S. cerevisiae*にこのタンパク質を生産させると、生育の誘導期が短縮され、温度などのストレスに耐性を示した。このBlp1タンパク質を生産することにより、*C. albicans*は血液中でのストレス環境に適応していると推定された。

3. ミックスドプロテオーム解析による *C. albicans* のマクロファージ破壊脱出機構の推測

血液には免疫細胞が存在し、*C. albicans*を貪食・殺菌してその感染を防いでいる。しかし、AIDSなどによるマクロファージ活性の低下が伴う場合、*C. albicans*はマクロファージに貪食されずに破壊して脱出し、全身に感染していくと報告されている。この過程については、既知の因子だけではその機構を完全に説明できてはおらず、未知の病原性タンパク質の関与も推定されている。

C. albicans のマクロファージ破壊脱出機構を詳細に解析するため、定量プロテオーム解析を行った。この解析のために、*C. albicans* とマクロファージを相互作用させた後、両者を分離せずにナノ LC-MS/MS 測定を行い、高分離能モノリスカラムによって2種の生物由来の多種ペプチドをオンラインで高速・精密に分離し、MS/MS とゲノム情報による網羅的なタンパク質の同定を行った。全体で 1736 個のタンパク質を定量できた。*C. albicans* では、グルコース合成、アミノ酸分解、プロテアソーム、ストレス応答関連のタンパク質生産が上昇し、リボソーム関連のタンパク質が減少していた。これらから、次のことが推定された。(1) マクロファージ内ではグルコース飢餓状態が生じ、*C. albicans* はプロテアソーム系により自身の不要なタンパク質を分解しつつ、 β 酸化系とグリオキシル酸回路を働かせて、枯渇しているグルコースを自ら作り出している。(2) マクロファージ内のストレスに対処するため、*C. albicans* は酸化ストレス、イオン欠乏ストレス、低 pH ストレスなどに対処するタンパク質を生産している。(3) *C. albicans* は、菌糸関連タンパク質、接着タンパク質、プロテアーゼ等を生産している。他にも、多くの機能未知タンパク質が同定され、これらは、マクロファージ内で、*C. albicans* のマクロファージ破壊脱出機構に重要な役割を担っていることが考えられた。一方、マクロファージのタンパク質としては、シャペロンタンパク質やアポトーシス関連タンパク質が顕著に減少していた。*C. albicans* はこれらマクロファージタンパク質を分解することで、マクロファージ活性の低下を誘導し、

破壊脱出しているのではないかと考えられた。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。
論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(論文審査の結果の要旨)

ほとんど未解明であった常在性真菌 *C. albicans* が引き起こすカンジダ症の新規病原因子について探索を行い、特徴的なタンパク質の検出・同定とその機能の推定を行った。成果として評価すべき点は以下の通りである。

1. *C. albicans* の病原性タンパク質候補である Als の性質解明

9種類の Als の生化学的性質を調べたところ、医療器具でよく使用されている素材に強く結合することを見出した。各 Als は細胞の疎水性を強めているのではなく、タンパク質分子独自の構造により、それらの材質に結合していることを明らかにした。

2. *C. albicans* の血液適応に関与する新規病原性タンパク質の探索

時系列定量プロテオーム解析により、*C. albicans* の血液適応過程への関与が示唆される新規な病原性候補のタンパク質の同定に成功した。*C. albicans* は血液存在下で、ストレス耐性タンパク質を生産し、栄養取り込み能を上昇させて、血液環境のストレス下で生存していることを明らかにした。また、新規な血液適応タンパク質として同定した Blp1 を酵母に生産させるとその生育の誘導期が短縮され、様々なストレス耐性を示すようになることが判明した。このタンパク質により、*C. albicans* はストレス環境に適応していることが示唆された。

3. ミックスドプロテオーム解析による *C. albicans* のマクロファージ破壊脱出機構の解析

C. albicans とマクロファージを相互作用させたのち、両者を分離せずにそのままタンパク質を抽出し、ナノ LC-MS/MS で同時に分離し、そのデータをオンラインでゲノム情報を元にして解析するミックスドプロテオーム解析の系を初めて構築した。その結果、*C. albicans* は、マクロファージに貪食された時、エネルギー生産能を上昇させ、ストレス耐性タンパク質や病原性候補のタンパク質を生産していることが判明した。また、マクロファージでは、アポトーシス関連タンパク質やシャペロンタンパク質の顕著な減少を発見した。このことから、*C. albicans* はマクロファージタンパク質を積極的に分解して、マクロファージの活性を低下させて破壊脱出している可能性を推定した。

以上のように、本論文は、*C. albicans* の接着タンパク質の性質を調べ、また、本微生物の血液適合過程やマクロファージ破壊過程に関与する病原因子について探索を行い、特徴的な因子を発見した。これにより、常在性真菌 *C. albicans* が原因のカンジダ症の作用機序が推定でき、新規治療法の開発が可能になるものと期待された。これらの結果は、生体高分子化学、分子臨床医学、感染症学、微生物科学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成28年2月8日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結

果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注）論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降（学位授与日から3ヶ月以内）